





© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	iii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Klasifikasi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu.....	2
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji.....	3
9 Higien.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh <i>yogurt</i>	4
Lampiran B (normatif) Cara uji <i>yogurt</i>	8
Bibliografi	48
Gambar B.1 - Uji CAMP untuk <i>Listeria monocytogenes</i> : pola inokulasi sheep blood agar plate	45
Gambar B.2 - Metoda pengenceran	48
Tabel 1 - Syarat mutu yogurt	2
Tabel A.1 - Nilai N, n, dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	5
Tabel A.2 - Nilai N, n, dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg	6
Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	6
Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg	6
Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg	7
Tabel A.6 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg.....	7
Tabel B.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat	14
Tabel B.3 - Reaksi biokimia dan serologi <i>Salmonella</i>	38
Tabel B.4 - Reaksi biokima dan serologi untuk non <i>Salmonella</i>	39
Tabel B.5 Kit-kit uji pendeteksi <i>Listeria</i> yang diizinkan	42
Tabel B.6 - Perbedaan beberapa spesies <i>Listeria</i>	44
Tabel B.7 Kit-kit uji yang berguna untuk konfirmasi isolat <i>Listeria</i> sebagai <i>Listeria monocytogenes</i> atau bukan*	44

Tabel B.8 Uji penguatan hemolisis CAMP dari spesies-spesies <i>Listeria</i>	45
Tabel B.9 Serologi untuk spesies <i>Listeria</i>	46



Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Yogurt* ini merupakan revisi dari SNI 01-2981-1992, *Yogurt*.

Tujuan penyusunan standar ini adalah :

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk atau pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri yogurt.

Dalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang Undang RI No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang Undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen
3. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemarkan Logam dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemarkan Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 November 2007 di Departemen Perindustrian. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 4 Agustus 2008 sampai dengan dengan 4 Oktober 2008 namun untuk mencapai kuorum diperpanjang sampai dengan tanggal 4 November 2008 dengan hasil RASNI.



Yogurt

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji yogurt. Standar ini hanya berlaku untuk yogurt yang siap konsumsi.

2 Istilah dan definisi

2.1

yogurt

produk yang diperoleh dari fermentasi susu dan atau susu rekonstitusi dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan atau bakteri asam laktat lain yang sesuai, dengan/atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

2.2

yogurt rendah lemak

yogurt dengan bahan baku susu rendah lemak atau susu rendah lemak rekonstitusi

2.3

yogurt tanpa lemak

produk yang diperoleh dari fermentasi susu skim atau susu skim rekonstitusi

3 Klasifikasi

3.1 Yogurt tanpa perlakuan panas setelah fermentasi

- a) Yogurt.
- b) Yogurt rendah lemak.
- c) Yogurt tanpa lemak.

3.2 Yogurt dengan perlakuan panas setelah fermentasi

- a) Yogurt.
- b) Yogurt rendah lemak.
- c) Yogurt tanpa lemak.

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

Susu dan/atau susu rekonstitusi; dengan atau tanpa lemak

4.2 Bahan pangan lain yang dapat ditambahkan

Bahan pangan yang diizinkan;

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk produk yogurt sesuai dengan ketentuan tentang Bahan Tambahan Pangan.

5 Syarat mutu

Syarat mutu yogurt sesuai Tabel 1 di bawah ini

Tabel 1 - Syarat mutu yogurt

No.	Kriteria Uji	Satuan	Yogurt tanpa perlakuan panas setelah fermentasi			Yogurt dengan perlakuan panas setelah fermentasi		
			Yogurt	Yogurt rendah lemak	Yogurt tanpa lemak	Yogurt	Yogurt rendah lemak	Yogurt tanpa lemak
1	Keadaan							
1.1	Penampakan	-	cairan kental - padat			cairan kental - padat		
1.2	Bau	-	normal/khas			normal/khas		
1.3	Rasa	-	asam/khas			asam/khas		
1.4	Konsistensi	-	homogen			homogen		
2	Kadar lemak (b/b)	%	min. 3,0	0,6 - 2,9	maks. 0,5	min. 3,0	0,6 - 2,9	maks. 0,5
3	Total padatan susu bukan lemak (b/b)	%	min. 8,2			min. 8,2		
4	Protein (Nx6,38) (b/b)	%	min. 2,7			min. 2,7		
5	Kadar abu (b/b)	%	maks. 1,0			maks. 1,0		
6	Keasaman (dihitung sebagai asam laktat) (b/b)	%	0,5-2,0			0,5-2,0		
7	Cemaran logam							
7.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,3			maks. 0,3		
7.2	Tembaga (Cu)	mg/kg	maks. 20,0			maks. 20,0		
7.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0			maks. 40,0		
7.4	Raksa (Hg)	mg/kg	maks. 0,03			maks. 0,03		
8	Arsen	mg/kg	maks. 0,1			maks. 0,1		
9	Cemaran mikroba							
9.1	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g atau koloni/g	maks. 10			maks. 10		
9.2	<i>Salmonella</i>	-	negatif/25 g			negatif/25 g		
9.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	negatif/25 g			negatif/25 g		
10	Jumlah bakteri starter*	koloni/g	min. 10 ⁷			-		
* sesuai dengan Pasal 2 (istilah dan definisi)								

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai Lampiran A.

7 Cara uji

Cara uji *yogurt* seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran B.1.
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran B.2.
 - Cara uji penampakan sesuai Lampiran B.2.1.
 - Cara uji bau sesuai Lampiran B.2.2.
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran B.2.3.
 - Cara uji konsistensi sesuai Lampiran B.2.4.
- c) Cara uji kadar lemak sesuai Lampiran B.3.
- d) Cara uji total padatan susu bukan lemak sesuai Lampiran B.4.
- e) Cara uji protein sesuai Lampiran B.5.
- f) Cara uji kadar abu sesuai Lampiran B.6.
- g) Cara uji keasaman (dihitung sebagai asam laktat) sesuai Lampiran B.7.
- h) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran B.8.
 - Cara uji timbal (Pb) dan tembaga (Cu) sesuai Lampiran B.8.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran B.8.2
 - Cara uji raksa (Hg) sesuai Lampiran B.8.3
- i) Cara uji arsen (As) sesuai Lampiran B.9.
- j) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran B.10.
- k) Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran 10.1.
- l) Cara uji bakteri *coliform* sesuai Lampiran B.10.2.
 - Cara uji bakteri *coliform* metode APM (Angka Paling Mungkin) sesuai Lampiran B.10.2.1
 - Cara uji bakteri *coliform* metode tuang sesuai Lampiran B.10.2.2.
- m) Cara uji *Salmonella* sesuai Lampiran B.10.3.
- n) Cara uji *Listeria monocytogenes* sesuai Lampiran B.10.4.
- o) Cara uji jumlah bakteri starter sesuai Lampiran B.11

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

9 Pengemasan

Yogurt dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan peraturan tentang label dan iklan pangan. Produk *yogurt* dengan perlakuan panas setelah fermentasi pada label harus dicantumkan tulisan "*Perlakuan panas*".

Lampiran A (normatif)

Cara pengambilan contoh yogurt

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh yogurt yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL (Acceptance Quality Level) 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) ukuran lot (N);
- c) ukuran kemasan terkecil (berat bersih dalam kg); dan
- d) ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalnya penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih meyakinkan;
- b) tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil yogurt;
- c) tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1;
- d) ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot;
- e) uji produk berdasarkan standar. Identifikasikan setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar;
- f) gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A; dan
- g) nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c);

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalnya lot terdiri atas 1200 karton yang masing-masing berisi 12 kemasan berukuran 350 g. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| a) ukuran lot (N) | : 1.200 x 12 atau 14.400 unit |
| b) ukuran kemasan | : 350 g |

- c) tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, Lampiran A.2.3.1)
 d) ukuran contoh (n) : 13
 e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a) ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
 b) ukuran kemasan : 350 g
 c) tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, Lampiran A.2.3.2)
 d) ukuran contoh (n) : 21
 e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh Lampiran A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, jumlah maksimum cacat yang diterima sebanyak 3 atau 4.

A.3 Rancangan pengambilan contoh

A. 3.1 Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1 - Nilai N, n, dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

Tabel A.2 - Nilai N, n, dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.3 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

A.3.2 Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)**Tabel A.4 - Nilai N, n dan c untuk berat bersih sama atau kurang dari 1 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

Tabel A.5 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.6 Nilai N, n dan c untuk berat bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19

Lampiran B (normatif)

Cara uji yogurt

B.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan yogurt dan ambil contoh yogurt sesuai yang diperlukan minimum 350 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisa kimia

Buka kemasan yogurt dan ambil contoh yogurt sesuai yang diperlukan minimum 350 g secara hati-hati dengan menggunakan sendok yang bersih dan kering, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering. Jika ukuran kemasan kurang dari 200 g, maka ambil beberapa kemasan sehingga yogurt menjadi 200 g

B.2 Keadaan

B.2.1 Penampakan

B.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisa terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

B.2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- lihat contoh uji untuk mengetahui apakah contoh berbentuk cairan kental padat; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Jika contoh berbentuk cairan kental-padat, maka hasil dinyatakan "**normal**";
- Jika contoh tidak berbentuk cairan kental-padat, maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

B.2.2 Bau

B.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisa terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 g dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji pada jarak kira-kira $\frac{1}{2}$ cm dari hidung untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas yogurt, maka hasil dinyatakan "**normal**"; dan
- b) jika tercium bau asing selain bau khas yogurt, maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

B.2.3 Rasa**B.2.3.1 Prinsip**

Melakukan analisa terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah).

B.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil kira-kira 1 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah; dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas yogurt, maka hasil dinyatakan "**normal**";
- b) jika terasa rasa asing selain rasa khas yogurt, maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

B.2.4 Konsistensi**B.2.4.1 Prinsip**

Melakukan analisa terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penglihatan (mata).

B.2.4.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji sebanyak 5 g dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) lihat contoh apakah contoh uji tersebut komponen padat dan cairan terpisah atau tidak; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.4.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika komponen padat tidak terpisah dengan cairannya, maka hasil dinyatakan homogen; dan
- b) jika komponen padat terpisah dengan cairannya, maka hasil dinyatakan tidak homogen.

B.3 Kadar lemak**B.3.1 Prinsip**

Lemak dalam contoh dihidrolisa dengan amonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam pinggan alumunium dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

B.3.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) pipet volumetrik 25 ml;
- c) penangas air;
- d) labu ekstraksi/ labu lemak *Majonnier*;
- e) sentrifuse;
- f) oven/oven vakum terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- g) desikator yang berisi desikan;
- h) piringan aluminium;
- i) gelas ukur;
- j) tang/penjepit; dan
- k) tutup labu.

B.3.3 Pereaksi

- a) Air suling;
- b) amonium hidroksida pekat;
- c) indikator fenolftalein 0,5 %;
- d) etil alkohol 95 %;
- e) etil eter, bebas peroksida; dan
- f) petroleum eter.

B.3.4 Cara kerja

- a) Timbang 5 g - 10 g contoh yogurt (W) ke dalam labu ekstraksi, tambahkan 10 ml air suling, aduk sehingga membentuk pasta, dan panaskan jika diperlukan;
- b) tambahkan 1 ml sampai dengan 1,25 ml ammonium hidroksida pekat, panaskan dalam penangas air pada suhu 60 °C – 70 °C selama 15 menit, diaduk beberapa kali dan dinginkan;
- c) tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 ml alkohol 95 %, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik;
- d) untuk ekstraksi pertama; tambahkan 25 ml etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- e) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- f) tambahkan 25 ml petroleum eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kencang selama 1 menit;
- g) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- h) sentrifuse labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan fasa air (*bright pink*) dan eter dengan jelas;
- i) tuangkan lapisan eter dengan hati-hati ke dalam labu lemak atau piringan aluminium kosong yang telah diketahui bobotnya (W_0);
- j) lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya;
- k) untuk ekstraksi kedua, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan penambahan 5 ml alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter;
- l) untuk ekstraksi ketiga, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan tanpa penambahan alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter; (ekstraksi ke-3 tidak perlu dilakukan untuk yogurt tanpa lemak)
- m) uapkan pelarut di atas penangas air dan keringkan labu lemak/piringan aluminium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven pada suhu (100 ± 1) °C selama 30 menit atau oven vakum pada suhu 70 °C – 75 °C dengan tekanan < 50 mm Hg (6,7 kPa); dan
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang hingga bobot tetap (W_1).

B.3.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{W} \times 100 \%$$

dengan;

W adalah bobot contoh, (g);

W₀ adalah bobot labu lemak/pinggan aluminium kosong, (g);

W₁ adalah bobot labu lemak/pinggan aluminium kosong dan lemak, (g).

B.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau RSD lebih besar dari 4 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.4 Total padatan susu bukan lemak

B.4.1 Prinsip

Total padatan susu bukan lemak adalah total padatan dikurangi total gula dan total lemak.

B.4.2 Penetapan total padatan

B.4.2.1 Prinsip

Total padatan dihitung sebagai berat contoh yang tersisa setelah pemanasan dalam oven pada suhu $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 4 jam.

B.4.2.2 Peralatan

- Pinggan untuk menimbang berdiameter 5 cm;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas air;
- desikator berisi desikan silika;
- tang/penjepit; dan
- oven terkalibrasi.

B.4.2.3 Cara kerja

- Timbang pinggan/kotak timbang kosong yang sebelumnya telah dipanaskan didalam oven $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama ≥ 2 jam (W). Timbang juga 1 pinggan kosong sebagai blangko (B₁), kemudian pinggan kosong dipanaskan pada oven suhu $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama ≥ 2 jam sebagai blangko (B₂);
- timbang 3 g contoh (yang sudah dipanaskan pada $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam pinggan tadi (W₁);
- masukkan pinggan berisi contoh dan pinggan kosong ke dalam oven dan keringkan selama 4 jam pada suhu $(100 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (selama pengeringan pintu oven jangan dibuka); dan
- pindahkan pinggan dalam desikator dan biarkan dingin pada suhu kamar (30 menit) kemudian timbang (W₂).

B.4.2.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan (\%)} = \frac{W}{(W_1 - W_2) - (B_1 - B_2)} \times 100 \%$$

dengan :

- W adalah berat pinggan, (g);
 W₁ adalah berat pinggan + contoh *yogurt*, (g);
 W₂ adalah berat pinggan + *yogurt* kering, (g);
 B₁ adalah berat blangko sebelum dipanaskan, (g);
 B₂ adalah berat blangko sesudah dipanaskan, (g).

B.4.2.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan disarankan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil total padatan

B.4.3 Total gula dihitung sebagai sakarosa

B.4.3.1 Prinsip

Sakarosa dihidrolisa menjadi gula pereduksi. Jumlah gula pereduksi dapat mereduksi Cu²⁺ menjadi Cu⁺. Kelebihan Cu²⁺ dititar dengan cara iodometri. Jumlah Cu²⁺ ditetapkan pada titrasi blangko. Perbedaan antara penitaran blangko dan contoh dapat dihitung sebagai jumlah gula pereduksi (menggunakan Tabel B.1)

B.4.3.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- erlenmeyer* 500 ml terkalibrasi;
- pipet volumetrik 10 ml, 25 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- labu ukur 100 ml, 250 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- buret 50 ml terkalibrasi;
- penangas listrik;
- penangas air;
- pendingin tegak;
- termometer;
- batu didih; dan
- stopwatch*.

B.4.3.3 Pereaksi

- larutan *Luff Schoorl*;
 - larutkan 143,8 g Na₂CO₃ an hidrat dalam 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling.
 - tambahkan 25 g CuSO₄.5H₂O yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling.
 - pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 1 liter, tepatkan larutan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok.
 - biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu²⁺ 0,2 N dan Na₂CO₃ 2 M.
- larutan kalium iodida, KI 20 %;
 larutkan 20 g kalium iodida p.a. dengan air suling hingga 100 ml.
- larutan asam sulfat, H₂SO₄ 25 % dan 3 M;
 - H₂SO₄ 25 %;

- larutkan 138 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan 745 ml air suling.
- H_2SO_4 3 M;
larutkan 84 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan air suling hingga 1 L.
 - d) larutan natrium tio sulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N;
- larutkan 100 ml larutan natrium tiosulfat 1 N dengan air suling bebas CO_2 menjadi 1 L;
- pembuatan natrium tiosulfat 1 N;
larutkan 248 g natrium tiosulfat 5 H_2O dengan air suling bebas CO_2 (yang sudah dididihkan terlebih dahulu) sehingga 1 L.
- standardisasi natrium tiosulfat 0,1 N.
 - e) larutan asam klorida, HCl 25 % dan 4 N;
- HCl 25 %;
640 mL HCl p.a. (\pm 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
- HCl 4 N;
356 ml HCl p.a. (\pm 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
 - f) indikator kanji 0,5 %;
larutkan 0,50 g amilum dengan air panas menjadi 100 ml.
 - g) larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 M;
 - h) larutan indikator fenolftalen 1 %;
larutkan 1 g fenolftalein p.a. dengan alkohol 60 % hingga 100 ml.
 - i) larutan seng asetat, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 N; dan
timbang 55 g Zn asetat 2 H_2O , kemudian larutkan dengan air suling menjadi 100 ml.
 - j) larutan kalium ferisianida, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,5 N.
larutkan 5,3 g kalium ferisianida dengan air suling hingga 100 ml.

B.4.3.4 Cara kerja

- a) Timbang 2 g - 10 g contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan air dan kocok;
- b) tambahkan 2,5 ml Zn asetat dan kocok;
- c) tambahkan 2,5 ml larutan kalium ferisianida. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,5 N sudah cukup;
- d) goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling dan kocok, biarkan kira-kira 30 menit dan saring;
- e) pipet 50 ml hasil penyaringan ke dalam labu ukur 100 ml;
- f) tambahkan 5 ml HCl 25 %, hidrolisis dalam penangas air suhu $68^\circ\text{C} - 70^\circ\text{C}$ selama 10 menit (menggunakan *stopwatch*);
- g) angkat labu ukur dan termometer dibilas dengan air dan dinginkan;
- h) pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* ke dalam *Erlenmeyer* 500 ml tertutup asah, tambahkan 10 ml larutan hasil saringan (dengan menggunakan pipet) dan 15 ml air suling agar volume menjadi 50 ml serta beberapa butir batu didih;
- i) pemipetan contoh dapat diperkecil dan atau diperbesar tergantung dari kandungan gula pereduksi dalam contoh. Apabila terbentuk endapan merah dan warna biru dari larutan hilang, perkecil pemipetan. Sebaliknya apabila endapan merah tidak terbentuk sama sekali, perbesar pemipetan. Penambahan air diatur sehingga volume akhir 50 ml;
- j) hubungkan *Erlenmeyer* dengan pendingin tegak, panaskan di atas pemanas listrik, usahakan dalam waktu 3 menit sudah mulai mendidih;
- k) panaskan terus selama 10 menit (pakai *stopwatch*) kemudian angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang, apabila warna biru dari larutan *Luff Schoorl* habis, maka pemipetan larutan contoh diperkecil/diulang);
- l) setelah dingin tambahkan 10 ml larutan KI 20 % dan 25 ml larutan H_2SO_4 25 % (hati-hati terbentuk gas CO_2);
- m) titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dan tambahkan 2 ml sampai dengan 3 ml indikator larutan kanji 0,5 % (V_1);

- n) lakukan penetapan blangko, pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* dan tambahkan 25 ml air suling, kerjakan seperti di atas (V_2);
 o) kerjakan penetapan duplo; dan
 p) hitung sakarosa dengan menggunakan Tabel B.1.

B.4.3.5 Perhitungan

Total gula dihitung sebagai sakarosa (%) = $0.95 \times \% \text{ gula sesudah inversi}$ dengan:

$$\text{Gula sesudah inversi (\%)} = \frac{W_1 \times fp}{W} \times 100 \%$$

dengan:

W_1 adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel B.1, (mg);

Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blangko dengan volume titar contoh (V_2 sampai dengan V_1);

fp adalah faktor pengenceran;

W adalah bobot contoh, (mg).

B.4.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar sakarosa atau deviasi (RSD) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau RSD lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

Tabel B.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	12,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1

Tabel B.1 - (Lanjutan)

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

B.4.4 Penetapan total padatan susu bukan lemak

Perhitungan :

Total padatan susu tanpa lemak (%) = total padatan (%) – total gula (%) - total lemak (%) (B.3).

B.5 Protein (N×6,38)

B.5.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H₂SO₄ menggunakan CuSO₄.5H₂O sebagai katalis dan K₂SO₄ untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi NH₃ pada saat destilasi menggunakan NaOH. NH₃ yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat, menghasilkan amonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38.

B.5.2 Peralatan

- Labu *Kjeldahl* 100 ml;
- distilator dan kelengkapannya;
- pemanas listrik/alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- buret 10 ml terkalibrasi; dan
- batu didih.

B.5.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H₂SO₄ pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga, CuSO₄.5H₂O bebas nitrogen 0,05 g/ml H₂O;
larutkan 5 g CuSO₄.5H₂O dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol tertutup gelas;
- katalis selen;
campurkan 4 g serbuk SeO₂, 150 g K₂SO₄ atau Na₂SO₄ dan 30 g CuSO₄.5 H₂O.
- kalium sulfat, K₂SO₄ bebas nitrogen;
- batu didih;
- larutan indikator *methylred* (MR)/*bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan

methyl red dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.

- g) larutan asam borat, H_3BO_3 4 %;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- h) larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- i) larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.
- j) larutan asam klorida, HCl 0,1000M.
pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36,5 % - 38 %) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

B.5.4 Cara kerja

- a) Timbang 1 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 batu didih sampai dengan 10 batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- b) panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- c) biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- d) tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- e) sulingkan selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;
- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1000 M; dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

B.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100 \%}{W} \times 100 \%$$

dengan:

- V_1 adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi contoh, (ml);
- V_2 adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi blanko, (ml);
- N adalah Normalitas larutan HCl ;
- W adalah bobot contoh, (mg);
- 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
- 6,38 adalah faktor protein untuk susu.

B.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau RSD lebih besar dari 4 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.6 Kadar abu

B.6.1 Prinsip

Bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu 525 °C sampai terbentuk abu berwarna putih. Kadar abu dihitung secara gravimetri.

B.6.2 Peralatan

- Desikator yang berisi desikan;
- cawan porselin/kwarsa yang berukuran 50 - 100 ml;
- oven terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas uap; dan
- pemanas listrik.

B.6.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu (525 ± 5) °C selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- masukkan 5 sampai dengan 10 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh dalam oven pada suhu (100 ± 2) °C sampai H_2O hilang;
- tambahkan beberapa tetes minyak zaitun murni dan panaskan perlahan di atas api atau lampu IR sampai pengembangan berhenti;
- tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tungku pembakaran pada suhu (525 ± 5) °C sampai terbentuk abu berwarna putih;
- tambahkan air ke dalam abu, keringkan dalam penangas uap kemudian dilanjutkan pada pemanas listrik kemudian diabukan kembali pada suhu (525 ± 5) °C sampai mencapai berat yang tetap;
- pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar abu dalam contoh.

B.6.4 Perhitungan

$$\text{Kadar Abu} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times 100 \%$$

dengan;

W_0 adalah bobot cawan kosong, (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah dikeringkan, (g).

B.6.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau deviasi lebih besar dari 4 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.7 Keasaman

B.7.1 Prinsip

Jumlah asam dihitung sebagai asam laktat.

B.7.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) buret mikro; dan
- c) *erlenmeyer* 250 ml.

B.7.3 Pereaksi

- a) Larutan NaOH 0,1 N;
5,3 ml lindi minyak (larutan NaOH 50 %) diencerkan dengan air suling hingga 1 L, lalu tetapkan normalitasnya dengan asam oksalat.
- b) Larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %.
Larutkan 1 g serbuk PP dengan alkohol 95 % dan encerkan hingga 100 ml.

B.7.4 Cara kerja

- a) Timbang sebanyak 20 g contoh (pipet 20 ml contoh) (W) masukkan ke dalam *erlenmeyer*;
- b) larutkan dalam air bebas CO₂ sebanyak 2 kali volume; dan
- c) tambahkan 2 ml indikator p.p dan titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.

B.7.5 Perhitungan

$$\text{Jumlah asam (\%)} = \frac{V \times N \times 90}{W} \times 100 \%$$

dengan :

- W adalah bobot contoh, (mg);
- V adalah volume larutan NaOH, (ml);
- N adalah normalitas larutan NaOH;
- 90 adalah bobot setara asam laktat.

B.8 Cemarkan logam

B.8.1 Penetapan cemarkan logam timbal (Pb) dan tembaga (Cu)

B.8.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

B.8.1.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- c) penangas listrik;

- d) kertas *Whatman* no. 41;
- e) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- f) spektrometer serapan asam (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cu dan Pb) terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 10 ml;
- j) gelas piala 250 ml; dan
- k) penangas air.

B.8.1.3 Preaksi

- a) Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19);
- c) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol;
Larutkan 10 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
Larutkan 1,000 g Cu dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cu 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- g) larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
pipet 10 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan HNO_3 0,1 N sampai tanda garis dan kocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu.
- h) Larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ Cu;
pipet 10 ml larutan baku 200 $\mu\text{g/ml}$ Cu ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/ml}$ Cu.
- i) larutan baku kerja Cu;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 5 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- j) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb;
pipet 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/ml}$ siap pakai.
- k) larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/ml}$.
- l) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 $\mu\text{g/ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 1,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 2,0 $\mu\text{g/ml}$ Pb.

B.8.1.4 Cara kerja

- Timbang dengan teliti 5 g - 10 g contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji menjadi arang dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml $\text{MgNO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan)
- lanjutkan pengabuan dalam tanur (500 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat bisa diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N atau 5 ml HNO_3 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai dengan 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V);
(jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring *Whatman* no. 41)
- siapkan larutan blangko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blangko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 324 nm untuk Cu dan 283 nm untuk Pb;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi; dan
- hitung kandungan logam dalam contoh.

B.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi ($\mu\text{g/ml}$);

V adalah volume larutan akhir (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisa harus diulang.

B.8.2 Penetapan timah (Sn)**B.8.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian ditambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.8.2.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) *erlenmeyer* 250 ml;
- c) penangas listrik;
- d) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- e) SSA beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- f) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- g) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- h) gelas ukur kapasitas 50 ml;
- i) gelas piala 250 ml; dan
- j) penangas air.

B.8.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium, 10 mg/ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) asam nitrat pekat, HNO₃ pekat;
- c) asam klorida pekat, HCl pekat;
- d) larutan baku 1000 mg/l Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml dan 25 µg/ml Sn.

B.8.2.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g - 20 g contoh (m) ke dalam *erlenmeyer* 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat, dan biarkan 15 menit;
- b) panaskan perlahan, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- c) lanjutkan pemanasan sampai sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- d) angkat *erlenmeyer* dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- e) tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai 15 ml;
- f) tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas *erlenmeyer* tersebut dengan 10 ml air suling;
- g) tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling, dan saring;
- h) siapkan larutan blangko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blangko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- j) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Sn (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- k) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- l) lakukan pengerjaan duplo; dan
- m) hitung kandungan Sn dalam contoh.

B.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$)

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

B.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.8.3 Penetapan raksa (Hg)

B.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa raksa dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan spektrofotometer serapan atom tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

B.8.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- penangas listrik;
- gelas ukur 25 ml; dan
- pipet ukur berskala 0,05 atau mikroburet terkalibrasi.

B.8.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 18 N;
- asam nitrat, HNO_3 7 N;
- batu didih;
- campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- larutan molibdat 2 %.
- larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- larutan pengencer;

masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling kedalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.

- j) larutan baku 1000 μg /ml Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) larutan baku 1 μg /ml Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1000 μg /ml Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 μg /ml.
- l) larutan baku kerja Hg;
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 μg /ml; 0,005 μg /ml; 0,01 μg /ml; dan 0,02 μg /ml Hg.

B.8.3.4 Cara kerja

B.8.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 18 N, 20 ml HNO_3 7 N, 1 ml larutan Natrium molibdat 2 %, dan 5 batu didih sampai dengan 6 batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml $\text{HNO}_3\text{:HClO}_4$ (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blangko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blangko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blangko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Hg (μg /ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

B.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 2 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Hg (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

B.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Hg (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times F_p$$

dengan:

- C adalah konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi, (µg /ml)
 V adalah volume larutan akhir, (ml);
 m adalah bobot contoh, (g);
 Fp adalah faktor pengenceran.

B.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.9 Cemarkan arsen (As)**B.9.1 Prinsip**

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As⁵⁺ direduksi dengan KI menjadi As³⁺ dan direaksikan dengan NaBH₄ atau SnCl₂ sehingga terbentuk AsH₃ yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.9.2 Peralatan

- Spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu *Kjeldahl* 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml;
- gelas ukur 25 ml;

- i) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- j) pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikroburet terkalibrasi; dan
- k) labu borosilikat berdasar bulat 50 ml.

B.9.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) asam perklorat, HClO_4 pekat;
- c) natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- d) asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 ml HCl 37 % ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- h) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- k) larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.9.4 Cara kerja

B.9.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 - 10 g contoh (m) dalam labu *Kjeldahl* 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 ml HClO_4 20 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml amonium oksalat jenuh;

- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- g) pipet 25 ml larutan di atas dan tambahkan 2 ml HCl, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

B.9.4.2 Destruksi dengan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam oven microwave dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) pipet 5 ml sampai dengan 10 ml larutan destruksi (c) kedalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambah 1 ml larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Uapkan diatas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur pada suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan dan larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$; 0,05 $\mu\text{g/ml}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

B.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times F_p$$

dengan:

- C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$);
 V adalah volume larutan akhir, (ml);
 m adalah bobot contoh, (g);
 Fp adalah faktor pengenceran.

B.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisa harus diulang kembali.

B.10 Cemaran mikroba

B.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji bakteri *coliform* dan jumlah bakteri starter

B.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk menggiatkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.10.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 8000 rpm sampai dengan 450000 rpm;
- neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- gelas piala steril;
- labu *erlenmeyer* steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi;
- alat pembuka kemasan steril;
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi; dan
- penangas listrik.

B.10.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB) :

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| - KH ₂ PO ₄ | 34 g |
| - air suling | 500 ml |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2 tepatkan volume sampai 1000 ml dengan air destilata. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigador untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai volume 1000 ml, kemudian dimasukkan kedalam tabung sebanyak 90 ml, atau (99 ± 1) ml dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

B.10.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 ml contoh dan masukkan ke dalam *erlenmeyer* yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.10.2 Bakteri *coliform***B.10.2.1 Cara uji bakteri *coliform* metode APM (Angka Paling Mungkin)****B.10.2.1.1 Prinsip**

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.10.2.1.2 Peralatan

- Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- lemari pengering (inkubator), (35 ± 1) °C;
- tabung reaksi dan tabung Durham;
- rak untuk tabung reaksi;
- jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm; dan
- penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi pada suhu ($45,5 \pm 0,2$) °C.

B.10.2.1.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- Lauryl sulfate tryptose (LST) broth/Lauryl tryptose (LST) broth*; dan
- brilliant green lactose bile (BGLB) broth 2 %*.

B.10.2.1.4 Cara kerja**B.10.2.1.4.1 APM - *Presumptive test* untuk bakteri *coliform*****B.10.2.1.4.1.1 Persiapan contoh uji**

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1;
- inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun, setelah inkubasi (48 ± 2) jam, karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif; dan
- lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

B.10.2.1.4.1.2 APM - *Confirmed Test* untuk bakteri *coliform* (uji penegasan)

- Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;

- c) masukkan tabung-tabung BGLB 2 % kedalam inkubator pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel APM Tabel B.2., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- e) laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

Tabel B.2 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

B.10.2.2 Cara uji bakteri *coliform* metode tuang

B.10.2.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam perbenihan yang cocok selama 18 sampai dengan 24 jam pada suhu $32 ^\circ\text{C}$ kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

B.10.2.2.2 Peralatan

- a) cawan petri (90-100 mm);
- b) pipet ukur 1 ml;
- c) inkubator suhu $32 ^\circ\text{C}$ dan $35 ^\circ\text{C}$.

B.10.2.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksia) *Violet red bile agar* (VRBA);

- yeast extract	3	g
- pepton	7	g
- sodium klorida	5	g
- garam <i>bile</i> no.3	1,5	g
- laktosa	10	g
- <i>neutral red</i>	0,03	g
- <i>crystal violet</i>	0,002	g
- agar	15	g
- air suling	1000	ml

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1000 ml air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir 7,4.

- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2 %; dan
c) *tryptic soy agar*.

B.10.2.2.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1;
b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4}) ke dalam cawan petri dan tuang dengan 10 ml VRBA bersuhu 48 °C, kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 ml VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
c) jika pengayaan diperlukan, tuangkan 8 ml sampai dengan 10 ml *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu 48 °C. Goyang cawan hingga agar rata kemudian inkubasi pada suhu ruang selama ($2 \pm 0,5$) jam. Kemudian lapisi dengan 8 ml sampai dengan 10 ml VRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
d) balikkan cawan dan inkubasikan kembali pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada 32 °C;
e) amati cawan di bawah penyorotan kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan *confirmed test* (uji penegasan untuk koloni yang positif);
f) *confirmed test* dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
g) inkubasikan tabung pada 35 °C. Amati setelah 24 jam - 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
h) tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif organisme *coliform*.

B.10.2.2.5 Perhitungan

$$\text{cfu (koloni/g)} = \text{koloni yang diduga} \times \frac{n}{a} \times F$$

dengan :

- n adalah jumlah tabung positif *coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas di tabung BGLB);
a adalah jumlah tabung BGLB;
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.10.2.2.6 Pernyataan hasil**B.10.2.2.6.1 Cara menghitung**

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram.;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$cfu = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$cfu = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$cfu = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
-----------	-----------	-----------------	--------------------------

$$\begin{array}{lll} \sim & 7150 & 65 & > 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 \quad (6.5 \times 10^6) \\ \sim & 6490 & 59 & > 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 \quad (5.9 \times 10^6) \end{array}$$

e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan

f) menghitung koloni perambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- merupakan rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

B.10.2.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5 maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5 maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5 maka bulatkan sebagai berikut :
 - Bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

B.10.3 *Salmonella*

B.10.3.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

B.10.3.2 Peralatan

- a) Neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) kertas pH;
- c) pipet 10 ml;
- d) pipet tetes;
- e) botol pengencer 1000 ml;
- f) tabung reaksi;
- g) gelas ukur 10 ml, dan 100 ml;
- h) cawan petri 90 mm sampai dengan 100 mm dan 140 mm -150 mm;
- i) gelas sediaan;
- j) inkubator 35 °C;
- k) oven;
- l) penangas air;
- m) pengaduk gelas;
- n) sengkelit (ose) / jarum inokulasi;

- o) pensil lilin
- p) bunsen; dan
- q) otoklaf.

B.10.3.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus terbuat dari individual ingredien, bukan formulasi komersial);
- b) *tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *hektoen enteric agar* (HE);
- e) *bismuth sulfite agar* (BSA);
- f) *triple sugar iron agar* (TSI);
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysine decarboxylation medium* (LDC);
- m) *nutrient agar*;
- n) *pereaksi kovacs*;
- o) *polyvalent somatic (o) test*;
- p) *polyvalent flagellar (h) test*;
- q) 1 N HCl;
- r) 1 N NaOH;
- s) larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) larutan *formalized physiological saline*;
- v) *rapid urea broth*;
- w) *mac conkey agar*;
- x) *simmon citrate agar*;
- y) *triptone broth*;
- z) *lactose broth*;
- aa) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- bb) *trypticase soy-trytose broth*;
- cc) *malonate broth*;
- dd) *lysine iron agar*;
- ee) *potassium cyanide* (KCN) *broth*;
- ff) *phenol red carbohydrate broth*;
- gg) *purple carbohydrate broth*;
- hh) *brain heart infussion* (BHI) *broth*;
- ii) *tryptose blood agar base*; dan
- jj) *bromocresol purple dye solution*, 0,2 %;

B.10.3.4 Cara kerja

B.10.3.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 ml contoh ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml *Lactose broth* steril, kocok merata sampai tidak ada gumpalan;
- b) biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$ dengan menambahkan 1 N NaOH atau 1 N HCl steril;
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *Brilliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan

- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $\frac{1}{4}$ putaran, inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C .

B.10.3.4.2 Pengkayaan

- Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml RV *medium* dan pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml *tetrathionate broth*; dan
- inkubasikan RV *medium* pada suhu $(42 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)^{\circ}\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

B.10.3.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar satu hari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*;
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :

Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut :

XLD : koloni berwarna merah muda (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.

HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.

- jika tidak ada koloni yang khas atau koloni yang diduga pada media BSA setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni yang diduga pada media BSA selama inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $5^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$;
- inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35°C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa H_2S (warna kehitaman agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung.

Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H₂S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;

- h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai no. f) di atas; dan
- i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap :
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, RV ;
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

B.10.3.5 Identifikasi *Salmonella*

B.10.3.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *Mac Conkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- a) *Mac Conkey agar*;
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- b) *Hektoen Enteric* (HE); dan
Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.
- c) *Xylose Lysine Desoxycholate* (XLD) agar.
Koloni merah muda (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti Lampiran B.10.3.4.3.f dan lanjutkan seperti pada Lampiran B.10.3.4.3.g.

B.10.3.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease konvensional; dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea agar*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- b) uji urease cepat;

Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inokulasikan 2 jam dalam *water bath* pada suhu $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

B.10.3.5.3 Pengujian kultur urease negatif

a) *Lysine Decarboxylase Broth (LDB)*

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam.

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone (tryptophane) broth (TB)*;

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

- *Potassium Cyanida (KCN) broth*;

Pindahkan 1 sengkeli (3 mm) dari biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan. Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*; dan

Pindahkan 1 sengkeli (3 mm) dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$, tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang *Malonate broth* tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- *Uji indol*

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml - 0,3 ml pereaksi *kovacs*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif atau KCN positif dan LDB negatif;

B.10.3.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan *reaksi urease* negatif ke dalam:

- 1) BHI *broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau
- 2) *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ (untuk uji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas;

b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formailized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar (H) antisera*. Masukkan $(\pm 0,5)$ ml

larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized antigen*. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C – 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam;

- c) positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol; dan
- d) negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

B.10.3.5.5 Uji serologi dengan *Polyvalent Somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil lilin, Buat garis persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau kaca gelas sediaan ;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85% *saline* menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *Tryptose Blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pinsil lilin;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent Somatic* (O) anti serum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi uji *polyvalent somatic* (O) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan; dan
 - tidak spesifik : terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol *saline*.

B.10.3.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada tabel 4 butir 1 sampai dengan 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi Flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada Lampiran B.10.3.5.1 di atas dan uji kembali pada Lampiran B.10.3.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.2 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
Inokulasi broth ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C, tetapi amati setelah 24 jam.
Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
Dinyatakan sebagai bukan *Salmonella* jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*;

- b) *Phenol red sucrose broth* atau *purple sucrose broth*;
Ikuti prosedur seperti pada 10.3.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red - Voges Proskauer* (MR – VP); dan
Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
Lakukan uji Voges-Proskauer (MR-VP) pada suhu ruang sebagai berikut :
Pindahkan 1 ml MR-VP broth yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP broth selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C . Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan aduk. Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif.
Uji merah metil (MR)
Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*
Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C :
- positif: apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dan hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil citrat positif; dan
- negatif: apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

B.10.3.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella*, kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella*, kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.4. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari Lampiran B.10.3.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel B.3 - Reaksi biokimia dan serologi *Salmonella*

No.	Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi Species
1	<i>Glucose</i>	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	<i>Lysine decarboxylase</i> (LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	H_2S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
4	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
5	<i>Lysine decarboxy Broth</i>	Warna ungu	Warna kuning	+

Tabel B.3 – (lanjutan)

6	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	Warna kuning dengan gas	Tanpa/tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	Warna biru	Tidak berubah warna	- ^c
9.	<i>Indol test</i>	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10.	<i>Polyvalent flagellar test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
11.	<i>Polyvalent somatic test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15.	<i>Methyl red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V

Keterangan :
^a adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari
 - adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari
 V adalah variabel
^b adalah mayoritas dari kultur *arizonate* : negatif
^c adalah mayoritas dari kultur *arizonate* : positif

Tabel B.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

No.	Test Substrat	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu merah)
2.	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
4.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^{a b}
5.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^b
6.	<i>Voges- Prokquer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)

Keterangan :
^a *Test malonate broth* positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut *Salmonella arizonate*
^b Jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan *Salmonella* uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut *Salmonella*

B.10.4 Cara uji *Listeria monocytogenes*

B.10.4.1 Prinsip

Mengisolasi bakteri *Listeria* dengan media yang diperkaya, kemudian diisolasi atau seleksi *Listeria monocytogenes* dari spesies *Listeria* yang lain dengan media yang selektif dilanjutkan dengan serologi.

B.10.4.2 Peralatan

- a) Neraca yang terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) tutup gelas preparat;
- c) *erlenmeyer* 500 ml;
- d) tabung fermentasi Durham;
- e) pensil atau *Marker*;
- f) inkubator, 30 °C dan 35 °C;
- g) minyak imersi;
- h) jarum lup;
- i) jarum inokulasi;
- j) gelas preparat;
- k) jarum, 26 *gauge*, 3/8 inchi;
- l) mikroskop fase kontras dengan objektif fase minyak imersi (100 x);
- m) cawan petri;
- n) pipet, 25, 10 dan 1 ml;
- o) tabung bertutup ulir, 16 x 125 mm atau ukuran yang sesuai;
- p) blender dan jar atau *stomacher* dan wadah; dan
- q) *syringe tuberculin*, steril dan *disposable*.

B.10.4.3 Perbenihan dan pereaksi*

- a) Asam asetat, 5 N;
- b) *acriflavine monohydrochloride*;
- c) agar (*Difco Laboratories*);
- d) *N*-(1-naphthyl) ethylene diamine;
- e) pereaksi α -Naphthol;
- f) *blood agar base no. 2 (unipath)*;
- g) *cycloheximide*;
- h) *natamycin (pimaricin)*;
- i) *sheep blood, debrinated*;
- j) etanol, *absolute*;
- k) *fluorescent antibody (FA) buffer* (*Difco*);
- l) *glycine anhydride*;
- m) *gram stain kit*;
- n) larutan hydrogen peroksida, 3 % untuk tes katalase;
- o) larutan KOH 40 %;
- p) *Listeria-typing sera set* (*Difco*);
- q) *lithium chloride-phenylethanol-moxalactam (LPM)* agar dengan ditambah *esculin* dan besi;
- r) *nalidixic acid (sodium salt)*;
- s) *nitrate reduction medium* dan *nitrate detection pereaksi*;
- t) *nutrient broth*;
- u) *physiological saline solution*, 0,85 %;
- v) *purple carbohydrate fermentation broth base*, mengandung 0,5 % larutan-larutan dekstrosa, *esculin*, maltosa, rhamnosa, mannitol dan xilosa;
- w) *SIM medium* (*Becton-Dickinson Microbiology Systems*) atau *motility test medium* (MTM, *Difco*);
- x) *perekasisulfanilic acid*;
- y) *trypticase soy agar* dengan 0,6 % *yeast extract* (TSAye);
- z) *trypticase soy broth* dengan 0,6 % *yeast extract* (TSBye);
- aa) media oxford (OXA);
- bb) *buffered Listeria enrichment broth* (BLEB);
- cc) agar PALCAM;

- dd) *carageenan* (Sigma type II);
- ee) agar BCM;
- ff) agar MOX;
- gg) agar ALOA;
- hh) agar *Chromogenic Listeria*;
- ii) rapid L'mono;
- jj) CHROMagar *Listeria*; dan
- kk) *tryptose broth and agar* (Difco).

*) Merk lain dapat digunakan asalkan media/pereaksinya sama.

B.10.4.4 Cara kerja

B.10.4.4.1 Prosedur pengambilan contoh dan pengayaan

B.10.4.4.1.1 Perlakuan contoh

Penyimpanan contoh dilakukan pada suhu 4 °C. Suhu tersebut direkomendasikan untuk penanganan, penyimpanan dan pengiriman bahan yang akan dianalisa. Bila contoh telah membeku, contoh tidak perlu dicairkan dulu, pencairan dilakukan pada waktu akan dianalisa.

B.10.4.4.1.2 Persiapan contoh

Timbang 25 g contoh padatan atau 25 ml contoh cair, tambahkan 225 ml BLEB. Selanjutnya dihomogenasi dengan blender atau *stomacher* sampai benar-benar homogen.

B.10.4.4.1.3 Pengkayaan

Setelah diinkubasi selama 4 jam pada suhu 30 °C, tambahkan agensia selektif (*cycloheximide*, jika agensia ini tidak tersedia, gunakan *pimaricin* atau *natamycin* pada 25 mg/L), dan lanjutkan inkubasi sampai 48 jam pada suhu 30 °C. Natamisin lebih aman digunakan daripada *cycloheximide*.

B.10.4.4.2 Prosedur Isolasi

Setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam, goreskan biakan BLEB ke salah satu media (agar) isolasi/seleksi yang mengandung *esculin* yaitu OXA, PALCAM, MOX dan LPM yang diperkaya dengan *esculin* dan besi (media-media ini diutamakan sesuai dengan urutannya). Selanjutnya media tersebut diinkubasi selama waktu dan suhu yang tertentu tergantung pada medianya, yaitu:

- OXA, PALCAM dan MOX pada suhu 35 °C selama 24 jam - 48 jam; dan
- LPM yang diperkaya pada suhu 30 °C selama 24 jam - 48 jam.

Koloni-koloni *Listeria* berwarna hitam dengan disertai *halo* berwarna hitam pada media-media yang mengandung *esculin*. Koloni bakteri tertentu lainnya akan berwarna hitam kecoklatan tetapi warna ini baru akan terjadi bila diinkubasi lebih dari 2 hari. Selanjutnya, pindahkan 5 atau lebih koloni yang berwarna hitam dengan halo tersebut dari media OXA dan PALCAM atau LPM yang diubah atau MOX ke media *Trypticase soy agar* dengan ekstrak yeast (TSAye), penggoresan ini ditujukan agar didapatkan koloni isolat yang khas dan murni.

Selain itu, sangat direkomendasikan untuk menggoreskan biakan pada salah satu media seleksi yaitu BCM, ALOA, *RapidL'mono* dan CHROMagar *Listeria* untuk membedakan *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii*, dan inkubasikan selama 48 jam (selain itu, diinkubasikan juga selama 24 jam) yang berguna untuk memilih media seleksi yang mengandung *esculin*. Rekomendasi ini dimaksudkan agar tidak terjadi kesalahan pengamatan *L. monocytogenes* oleh *L. innocua*. Koloni *L. monocytogenes* akan berwarna biru pada media BCM, sedangkan *L. ivanovii* seringkali tidak ada pada makanan. Sedangkan pada media ALOA koloni *L.*

monocytogenes dan *L. ivanovii* akan berwarna biru dan di sekelilingnya terdapat area lipolisis.

Pemurnian menggunakan media TSAye merupakan tahap yang harus dilakukan pada analisa konvensional karena koloni yang diisolasi (isolat) pada media agar seleksi mungkin masih tercampur dengan suatu kompetitor walaupun kompetitor ini terlihat kurang jelas. Sedikitnya diperlukan 5 isolat, karena lebih dari satu spesies *Listeria* mungkin dapat diisolasi dari contoh yang sama. Penggunaan media BCM dan ALOA akan membantu mengurangi jumlah koloni yang perlu diambil. *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii* dapat dikenali menggunakan media konfirmasi komersial (Biosynth International, Inc.) atau dengan *rhamnose/xylose fermentation broth/agars* yang konvensional.

Inkubasi cawan TSAye pada suhu 30 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Media ini juga dapat diinkubasi pada suhu 35 °C apabila koloni tidak akan digunakan untuk uji pergerakan secara basah (Lihat 10.4.4.3.2). Untuk metoda uji cepat yang telah diizinkan (Tabel B.5.) penggunaan media/agar isolasi yang selektif yang telah direkomendasikan oleh industri pembuatnya, dapat dilakukan tetapi, sebagai catatan diatas, penggunaan tambahan media/agar pembeda *L. monocytogenes* dan *L. ivanovii* yang baru juga direkomendasikan.

Tabel B.5 Kit-kit uji pendeteksi *Listeria* yang diizinkan

1. AOAC Official Method 993.09. 2000. *Listeria* in dairy products, seafoods, and meats. Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization method (GENE-TRAK *Listeria* Assay).
2. AOAC Official Method 994.03. 2000. *Listeria monocytogenes* in dairy products, seafoods, and meats. Colorimetric monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay method (*Listeria* Tek).
3. AOAC Official Method 995.22.2000. *Listeria* in foods. Colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method (TECRA *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA]).
4. AOAC Official Method 996.14.2000. Assurance (Polyclonal Enzyme Immunoassay Method).
5. AOAC Official Method 997.03.2000. Visual Immoprecipitate Assay.
6. AOAC Official Method 999.06.2000. Enzyme Linked Immunofluorescent Assay (ELFA) VIDAS LIS Assay Screening Method.

B.10.4.4.3 Uji identifikasi

B.10.4.4.3.1 Amati koloni-koloni yang diduga pada media cawan TSAye.

Pengamatan dengan menggunakan *Henry oblique transmitted illumination* sangat membantu pengamatan tahap ini, tetapi tahap ini bukan merupakan tahap yang harus dilakukan.

B.10.4.4.3.2 Ambil koloni yang diduga dari cawan biakan dan buat preparat basah dengan menggunakan *saline* 0,85 %, selanjutnya ditutup dengan gelas preparat. Tetesi minyak imersi dan periksa di bawah mikroskop fase kontras. Koloni yang dipilih berasal dari pertumbuhan yang padat. Jika koloni diambil dari pertumbuhan yang jarang, sel bakteri akan menempel pada gelas preparat dan tidak tampak bergerak. Spesies *Listeria* berbentuk tipis, tangkai pendek dengan sedikit berputar atau bergerak mendatar. Selalu bandingkanlah dengan biakan yang telah diketahui. Bakteri yang berbentuk kokus, batang yang besar atau batang dengan pergerakan cepat seperti berenang bukan sejenis *Listeria*. Sebagai alternatif, gunakan media uji 7 hari bergerak (lihat 10.4.4.3.8);

B.10.4.4.3.3 Lakukan uji katalase pada koloni yang diduga. Spesies *Listeria* termasuk katalase positif.

B.10.4.4.3.4 Buat pewarnaan gram untuk biakan yang berumur 16 jam - 24 jam. Semua spesies *Listeria* berbentuk kecil, batang gram positif, tetapi untuk biakan yang

lebih tua, reaksi pewarnaan dapat berubah-ubah dan selnya menyerupai batang (*coccoidal*). Sel-selnya cenderung membentuk pagar pada pewarnaan yang tebal. Ini dapat menyebabkan penolakan palsu yaitu dianggap sebagai suatu *diphtheroid*.

- B.10.4.4.3.5 Ambil koloni yang diduga dan tanam kedalam tabung TSBye untuk uji fermentasi karbohidrat dan media uji yang lain. Inkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam, biakan ini memungkinkan untuk disimpan pada suhu 4 °C selama beberapa hari dan digunakan berulang kali sebagai inokulum. Kit komersial tersedia untuk identifikasi isolat (Lihat 10.4.4.3.11).
- B.10.4.4.3.6 Inokulasikan koloni TSAye yang banyak ke media agar 5 % *sheep blood* dengan menusuk lempengan yang telah dituang tebal dan kering sempurna (periksa adanya air sebelum digunakan). Buat gambar lajur sebanyak 20 sampai dengan 25 di bagian luar dari alas Petri. Tusukan setiap biakan pada lajur. Selalu tusukan biakan kontrol positif (*L. ivanovii* dan *L. monocytogenes*) dan kontrol negatif (*L. innocua*). Inkubasikan selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 35 °C. Sebisa mungkin tusukan mendekati dasar lapisan agar, tanpa menyentuh dasar agar dan memecahkan agar.
- B.10.4.4.3.7 Amati lempengan *blood agar* yang telah ditusuk biakan dengan menggunakan cahaya terang. *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* memperlihatkan area yang agak terang disekeliling tusukan. *L. innocua* menunjukkan tidak ada area yang terhemolisis, sedangkan *L. ivanovii* memperlihatkan area terang yang jelas di sekitar tusukan. Jangan mencoba membedakan spesies-spesies pada tahap ini tetapi catat reaksi hemolitik yang terjadi. Reaksi-reaksi yang meragukan ini dapat diidentifikasi dengan uji CAMP. (Catatan: Hemolisis lebih mudah dianalisa jika kedalaman dari agar *blood* lebih tipis dari biasanya yaitu 5 mm. Boleh juga ini dicapai dengan penggunaan suatu teknik hamparan *blood agar* setebal 1 mm sampai dengan 2 mm).
- B.10.4.4.3.8 Uji reduksi nitrat. Uji ini dilakukan bila diperlukan. Hanya *L. grayi ssp murrayi* yang akan mereduksi nitrat. Uji ini akan membedakan *L. grayi ssp murrayi* dengan *L. grayi ssp grayi*. Gunakan biakan TSBye dan diinokulasikan ke dalam *nitrate broth*. Inkubasikan pada suhu 35 °C selama 5 hari. Tambahkan 0,2 ml pereaksi A, diikuti dengan 0,2 ml pereaksi B. Warna merah-ungu menunjukkan terdapatnya nitrit, yaitu nitrat yang telah direduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan bubuk *zinc* dan diamkan satu (1) jam. Warna merah-ungu yang muncul menunjukkan bahwa nitrat masih ada dan tidak tereduksi. Sebagai suatu prosedur alternatif, tambahkan 0,2 pereaksi A, diikuti dengan 0,2 ml pereaksi C. Terbentuknya warna oranye menunjukkan nitrat tereduksi. Jika tidak terjadi perubahan warna, tambahkan bubuk *zinc* seperti diatas. Munculnya warna oranye menunjukan nitrat tidak tereduksi.
- B.10.4.4.3.9 Inokulasi media SIM atau MTM dengan biakan dari TSBye. Inkubasikan selama 7 hari pada suhu ruangan. Amatilah tiap hari, spesies *Listeria* senantiasa bergerak dan membuat pola yang khas seperti payung terkembang sedangkan MTM akan memberikan pola payung yang paling jelas. Sebagai alternatif, amati biakan TSBye yang disimpan pada suhu 30 °C dengan mikroskop fase kontras (1000x), yang bergerak mendatar.
- B.10.4.4.3.10 Inokulasikan biakan dari kultur TSBye, ke dalam media karbohidrat 0,5 % dalam *purple carbohydrate broth* (kalau bisa gunakan tabung Durham): dekstroza, *esculin*, maltosa, rhamnosa, manitol dan xylosa. Inkubasikan selama 7 hari pada suhu 35 °C. Spesies *Listeria* akan memberikan reaksi positif bila menghasilkan asam tanpa terbentuknya gas. Cocokkan dengan Tabel B.6 untuk reaksi-reaksi spesies *Listeria* terhadap xylosa, rhamnosa dan maltosa. Semua spesies akan menghasilkan reaksi positif terhadap dekstroza, *esculin* dan maltosa. Semua spesies *Listeria*, kecuali *L. grayi*, akan

menghasilkan reaksi negatif pada manitol. Jika terjadi pewarnaan isolat pada media OXA, PALCAM, MOX, atau LPM yang ditambah *esculin*/ Fe^{3+} tidak meragukan lagi, uji eskulin bisa ditiadakan.

Tabel B.6 - Perbedaan beberapa spesies *Listeria*

<u>Species</u>	Asam yang diproduksi dari				
	β -hemolisis ^a	mannitol	rhamnosa	xylosa	virulence ^b
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i> ^c	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V ^d	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V ^d	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i> ^e	-	+	V ^d	-	-

Keterangan:

^a sheep blood agar stab.

^b uji Mouse.

^c strain yang dapat memfermentasi ribosa diklasifikasikan sebagai *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* dan yang tidak memfermentasi ribose sebagai *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*.

^d V, variable biotypes.

^e termasuk 2 (dua) subspecies - *L. grayi* subsp. *murrayi* yang mereduksi nitrat dan *L. grayi* subsp. *grayi* tidak mereduksi nitrat

B.10.4.4.3.11 Isolat yang dimurnikan mungkin dapat diidentifikasi secara cepat dengan menggunakan kit komersial (uji tambahan mungkin diperlukan untuk uji spesies secara lengkap): *Vitek Automicrobic Gram Positive* dan *Gram Negative Identification cards* (bioMerieux, Hazelwood, MO) atau *API Listeria* (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) yang tidak memerlukan uji CAMP tambahan. MIKRO-ID™ kit (bioMerieux, Hazelwood, MO; 1,24) membolehkan penentuan spesies isolate-isolat *Listeria* apabila reaksi CAMP telah dilakukan dan mengenalinya. Baru-baru ini telah diperkenalkan suatu kit untuk penentuan *Listeria* yaitu Phenotype MicroArray (BIOLOG, Hayward, CA).

B.10.4.4.3.12 Metode uji cepat alternatif yang dapat mengidentifikasi isolat *Listeria* sebagai *Listeria monocytogenes* tercantum pada Tabel B.7. Isolat-isolat mungkin diidentifikasi dalam biakan murni atau dari media OXA atau media agar isolasi selektif yang lain, tergantung pada kitnya. Isolat yang dimurnikan yang telah diidentifikasi sebagai *Listeria monocytogenes* dengan uji-uji ini harus disimpan untuk acuan (kepentingan) regulasi.

Tabel B.7 Kit-kit uji yang berguna untuk konfirmasi isolat *Listeria* sebagai *Listeria monocytogenes* atau bukan*.

1. *AccuProbe™ Listeria monocytogenes culture confirmation test* (Gen-Probe, Inc, San Diego, CA).
2. *GeneTrak Listeria monocytogenes test kit* (Neogen, Lansing).
3. *Probelia Listeria monocytogenes test kit* (BioControl, Seattle, WA).
4. *VIDAS Listeria monocytogenes test kit* (bioMerieux).
5. *Transia Plate Listeria monocytogenes* (Diffchamb SA, Lyon, France).
6. FDA, SRL *application of Niederhauser et al. method for PCR detection and identification of L. monocytogenes*.
7. *BAX Listeria monocytogenes test* (Qualicon, Inc, Wilmington, DE).

* Kit-kit ini mempunyai berbagai tingkat keabsahan (kevalidan) dan apabila validasi nya cocok dapat juga digunakan untuk menyaring pengkayaan *L. monocytogenes*. Sekarang ini, FDA hanya menguraikan kit yang telah divalidasi untuk semua spesies *Listeria*.

B.10.4.4.4 Uji CAMP

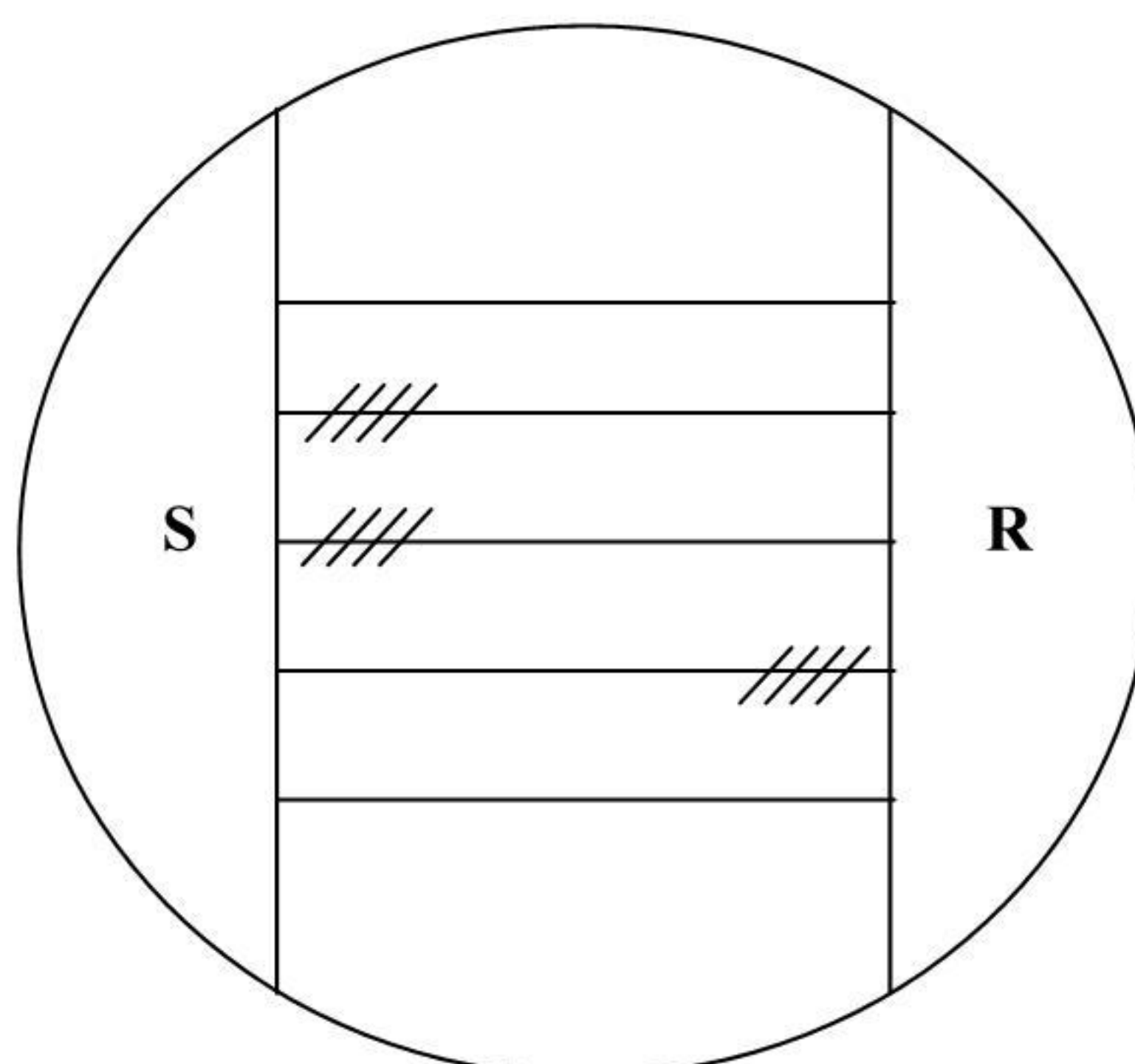
Uji Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) (Tabel B.8. dan Gambar 1) berguna untuk konfirmasi spesies *Listeria* terutama jika uji *blood agar stab* menunjukkan hasil yang samar-samar.

Uji ini dilakukan dengan menggoreskan biakan β hemolitik *Staphylococcus aureus* dan *Rhodococcus equi* secara parallel /sejajar dan diametris berlawanan satu dengan yang lain pada media agar *sheep blood*. Goreskan beberapa biakan yang diuji sejajar terhadap yang lain tetapi membuat sudut kearah kanan dan diantara goresan *S. aureus* dan *R. equi*. Setelah inkubasi pada 35°C selama 24 jam sampai dengan 48 jam, amati cawan-cawan tersebut adanya hemolisis. Reaksi hemolisis *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* diperjelas (diperkuat) pada area yang dipengaruhi oleh goresan *S. aureus*. Spesies yang lain tetap tidak menunjukkan reaksi hemolisis. Reaksi *L. monocytogenes* sering kali optimal pada penyimpanan 24 jam daripada 48 jam. Untuk mendapatkan *R. equi* yang cukup agar terjadi goresan (pertumbuhan) yang baik, inkubasikan biakan agar miring selama 48 jam daripada 24 jam. Direkomendasikan untuk menggunakan isolat kontrol (pembanding) *Listeria spp* yang dikenal pada cawan media/agar *sheep blood* yang terpisah. Media/agar *sheep blood* yang digunakan harus sebaru/sesegar mungkin.

Tabel B.8 Uji penguatan hemolisis CAMP dari spesies-spesies Listeria.

Species	Pengkayaan hemolysis	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> ®
<i>L. monocytogenes</i>	+	-*
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

* Strain-strain yang jarang adalah S+ dan R+. Reaksi R+ kurang dikenal dibandingkan *L. ivanovii*. Strain-strain untuk uji CAMP tersedia dari koleksi-koleksi biakan, termasuk American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA.



Gambar B.1 - Uji CAMP untuk Listeria monocytogenes: pola inokulasi sheep blood agar plate

Garis horizontal menggambarkan goresan inokulasi dari 5 test strains. Garis vertikal menggambarkan goresan inokulasi *Staphylococcus aureus* (S) and *Rhodococcus equi* (R).

Garis-garis hatched menunjukkan (hanya merupakan gambaran) lokasi daerah penguatan hemolisis.

Goreskan *strain* FDA β hemolytic *Staphylococcus aureus* ATCC 49444 (CIP 5710 ; NCTC 7428) atau *strain* ATCC 25923 dan *Rhodococcus equi* (ATCC 6939; NCTC 1621) secara vertikal pada agar *sheep blood* dengan pelan. Pisahkan goresan secara vertikal, oleh karena itu *strain-strain* yang diuji mungkin digoreskan secara horizontal diantaranya tanpa saling bersentuhan. Sesudah diinkubasi 24 jam dan 48 jam pada suhu 35 °C, amati adanya hemolisis di area yang dipengaruhi oleh goresan-goresan vertikal. Lihat Gambar 1 yang menunjukkan susunan goresan-goresan biakan pada media CAMP). Hemolisis dari *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* diperkuat (makin jelas) didekat goresan *S. aureus*; hemolisis *L. ivanovii* diperkuat (makin jelas) didekat goresan *R. Equi*. Spesies yang lain yaitu non-hemolisis, tidak akan bereaksi pada uji ini. Uji CAMP ini akan membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dan dapat membedakan suatu *L. seeligeri* yang mempunyai kemampuan hemolisis lemah (yang mungkin dilihat sebagai non-hemolisis) dari *L. welshimeri*. Isolat-isolat yang memberikan reaksi khusus untuk *L. monocytogenes* (kecuali hemolisis) harus melalui uji CAMP sebelum diidentifikasi sebagai *L. innocua*. Suatu faktor yang mudah disiapkan dari biakan *S. aureus* dapat digunakan untuk memperkuat hemolisis oleh *L. monocytogenes* dan *L. seeligeri* pada cawan media/agar *sheep blood*. Suatu disk (piringan) yang telah diisi dengan β lisin dari *S. aureus* (REMEL, Lenexa, KS) dapat digunakan untuk tujuan yang sama.

B.10.4.4.5 Serologi

Uji ini dilakukan berdasarkan pertimbangan epidemiologi yang sangat mendesak. Gunakan biakan TSBye untuk diinokulasikan pada media *Tryptose broth*. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35 °C, yaitu suhu antigen flagella (H) berkurang. Pindahkan ke kedua tabung agar miring *Tryptose agar* dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35 °C. Cuci kedua agar miring sebanyak 3 ml *Difco fluorescent antibiotic* (Fa) *buffer* dan pindahkan ke tabung tertutup 16 x 125 mm. Panaskan dalam penangas air pada suhu 80 °C selama 1 jam. Sentrifus pada 1600 x g selama 30 menit. Pindahkan 2,2 ml sampai dengan 2,3 ml cairan lapisan atas dan encerkan kembali padatan dalam *buffer*. Ikutilah rekomendasi-rekomendasi yang dikeluarkan industri pembuatnya untuk prosedur pengenceran serum dan penggumpalan. Jika perlakuan serotip flagella (H) atau sub-faktor somatik (O) diinginkan, lihat Bab 11 (Bacteriological Analytical Manual).

Tabel B.9 Serologi untuk spesies *Listeria*

Spesies	Tipe Serotipe
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, Un ^a
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, Un ^a
Catatan Un ^a adalah tidak mutlak	

B.10.4.4.6 Pernyataan hasil

Semua *Listeria spp* adalah berbentuk batang kecil, katalase-positif, gram-positif yang menunjukkan gerakan dalam preparat basah dan media SIM. *Listeria* menggunakan dekstrose, *esculin* dan maltosa dan beberapa spesies menggunakan mannitol, rhamnosa dan xylosa sehingga dihasilkan asam. Suatu spesies yang menggunakan mannitol dengan

menghasilkan asam adalah *L. grayi*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, dan *L. seeligeri* menghasilkan hemolisis pada tusukan *sheep blood* dan oleh karena itu uji CAMPnya menunjukkan hasil positif. Dari ketiganya, hanya *L. monocytogenes* yang tidak dapat menggunakan xylosa dan positif dapat menggunakan rhamnosa. Kesulitan dalam membedakan *L. ivanovii* dari *L. seeligeri* dapat diatasi dengan melakukan uji CAMP. *L. seeligeri* menunjukkan peningkatan hemolisis pada goresan *S. aureus* sedangkan *L. ivanovii* menunjukkan peningkatan pada goresan *R. Equi*. Dari spesies-spesies non-hemolisis, *L. innocua* mungkin memberikan reaksi yang sama terhadap rhamnosa-xylosa seperti *L. monocytogenes* tetapi akan negatif pada uji CAMP. *L. innocua* kadang-kadang akan memberikan tes yang negatif pada penggunaan rhamnosa. Isolat *L. welshimeri* yang adalah rhamnosa negatif mungkin atau kadang-kadang keliru dengan *L. seeligeri* yang mempunyai hemolisis lemah jika tidak diuji dengan uji CAMP.

Setelah semua hasil-hasil yang lain tersedia, seperti serotip *Listeria* dan uji-uji lain, penentuan isolat *Listeria* menjadi sangat berarti. Data biokimia, serologi dan pathogenitas dijabarkan pada Tabel B.6, B.8, dan B.9. Semua data yang diperoleh atau dikumpulkan harus lengkap sebelum penentuan spesies.

B.11 Jumlah Bakteri Starter

B.11.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri fakultatif an-aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 3 hari pada suhu 35 °C atau 5 hari pada suhu 30 °C.

B.11.2 Peralatan

- Cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril;
- pipet ukur 1ml, 5 ml, dan 10 ml;
- penangas air; (45 ± 1) °C;
- lemari pengering (inkubator);
- alat penghitung koloni (*colony counter*);
- otoklaf; dan
- oven/Alat sterilisasi kering terkalibrasi.

B.11.3 Pembenihan dan pengencer

- De Man Rogosa and Sharpe* (MRS);

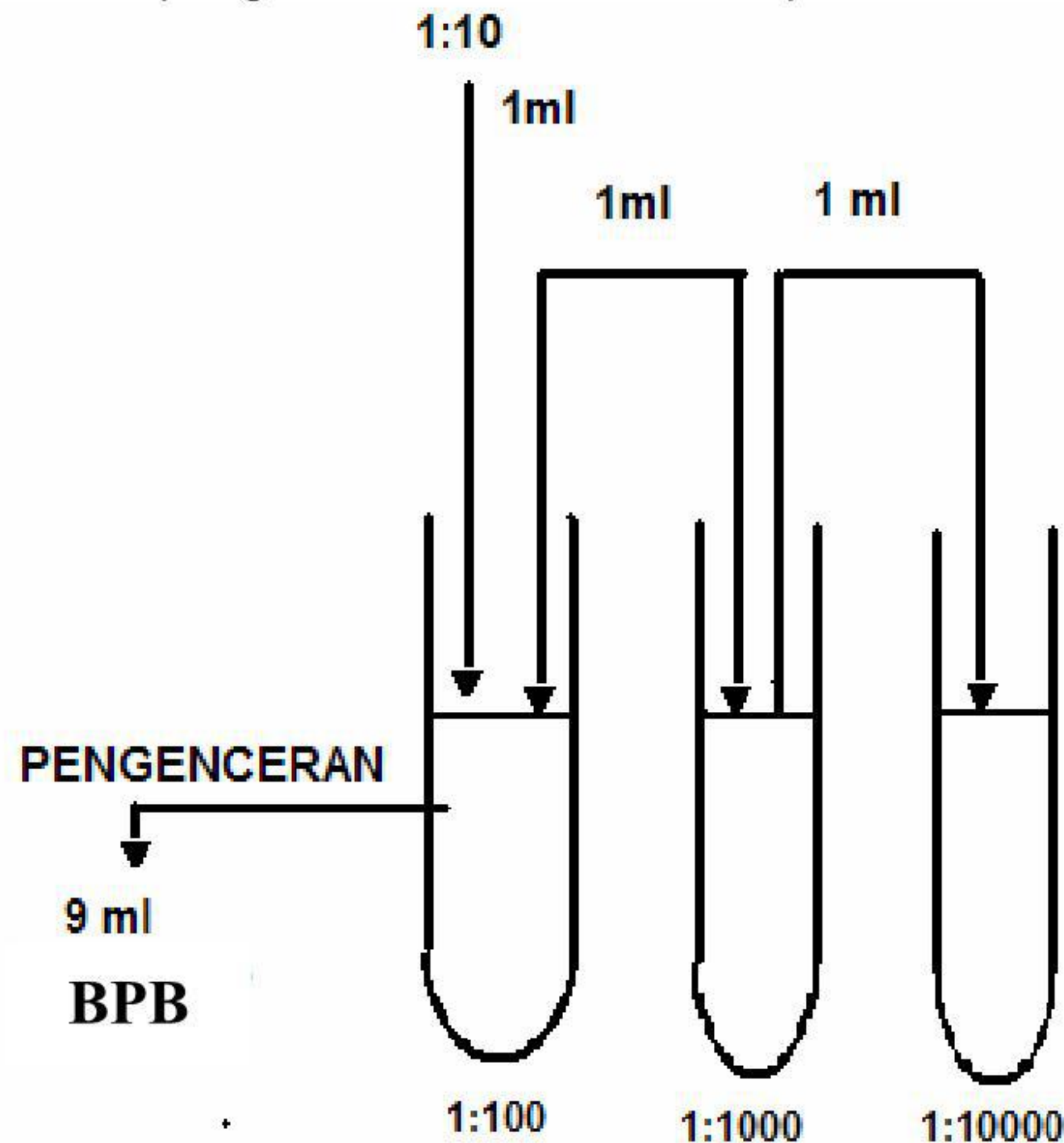
- pepton dari kasein	10,0 g
- ekstrak daging	8,0 g
- ekstrak yeast	4,0 g
- D(+)-glukosa	20,0 g
- dipotasium hidrogen fosfat	2,0 g
- <i>tween</i> 80	1,0 g
- diamonium hidrogen sitrat	2,0 g
- sodium asetat	5,0 g
- magnesium sulfat	0,2 g
- mangan sulfat	0,04g
- agar	14,0 g
- air suling	

Larutkan 66,2 g MRS agar atau 52,2 MRS *broth* ke dalam air suling sehingga menjadi 1 liter. Otoklaf selama 15 menit pada suhu 118 °C . Atur pH media (5,7 ± 0,2) pada suhu 25 °C . Media yang terbentuk berwarna coklat dan jernih; dan

- Larutan pengencer *Butterfields Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB)

B.11.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.10.1;
- buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar 2 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);

**Gambar B.2 - Metoda pengenceran**

- pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media MRS yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan pemeriksaan blangko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram (inkubator) pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama 3 hari atau suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama 5 hari. Jika memungkinkan inkubasi dilakukan dalam udara yang diperkaya dengan CO_2 dalam suatu jar anaerob; dan
- catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 3 hari atau 5 hari.

B.11.5 Perhitungan

Jumlah bakteri starter (koloni/g) = $n \times F$

dengan:

n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dengan koloni/g

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.11.6 Pernyataan hasil**B.11.6.1 Cara menghitung**

Cara menghitung jumlah bakteri starter seperti cara menghitung pada bakteri *coliform* metode tuang.

B.11.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka jumlah bakteri starter seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada bakteri *coliform* metode tuang.



Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 947.05, Acidity of Milk* 18th Edition, Chapter 33.2.06.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 945.46, Ash of Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.10.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 989.05, Fat in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.26.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Food*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 991.20, Nitrogen (Total) in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.11.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 968.12, Sampling of Dairy Products*, 18th Edition, Chapter 33.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.19, Solid (total) in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.43.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.20, Solid (total) in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.44.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 990.20, Solids-Not-Fat in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.45.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 18th Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2000. *AOAC Official Method 966.23, Microbiological Methods*, 17th Edition, Chapter 17.2.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.16, Tin in Canned Foods*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. 2005. kategori pangan 01.0. Produk-produk susu dan Analognya, kecuali yang termasuk Kategori 02.0
- Codex Alimentarius Commission. 1996. *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Food (AQL-6,5) CAC/RM 42/1966*.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. 2002. *Enumeration of Echerichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. 2006. *Salmonella*. Chapter 5.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. 2003. *Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes* in Foods. Chapter 10.

Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.

Merck Microbiology Manual. DEMAN, ROGOSA, and SHARPE, 12th Edition.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id